

Aus der Veterinär-Chirurgischen Klinik der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. A. Müller)
und aus dem
Institut für Molekularbiologie der ETH-Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Schwyzer)

Einflüsse der Bewegung im Schritt auf die Synovia der vorderen Fesselgelenke beim Pferd

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Arnold Robert Schwyzer
dipl. Chemiker ETH
und Tierarzt
von Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. A. Müller, Referent
Prof. Dr. Dr. C. Kuenzle, Korreferent

Zürich 1981

1982

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG
2. EXPERIMENTELLER TEIL UND MATERIAL
 - 2.1 Versuchspferde und Versuchsanordnung
 - 2.2 Implantation eines Dauerkatheters ins Fesselgelenk
 - 2.3 Probeentnahmen und intraartikuläre Injektionen durch die Braunüle
 - 2.4 Fluoreszenzmessungen
 - 2.4.1 Apparatur
 - 2.4.2 Eigenschaften der Synovia
 - 2.4.3 Herstellung der Proben
 - 2.4.4 Messprinzip
 - 2.4.5 Auswertung der Kurven
 - 2.5 Substanzen zur Messung der intraartikulären Verdünnung (Volumenbestimmung)
 - 2.5.1 Tabakmosaikvirus (TMV) mit Fluoreskamin umgesetzt (TMV-F)
 - 2.5.2 Bovines Serum Albumin (BSA) mit Fluoreskamin umgesetzt (BSA-F)
 - 2.5.3 Equines Serum Albumin (ESA) mit Fluoreskamin umgesetzt (ESA-F)
 - 2.5.4 Bovines Serum Albumin (BSA) mit Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat, Isomer R umgesetzt (BSA-RITC)
 - 2.6 Viskositätsmessungen
 - 2.6.1 Apparatur
 - 2.6.2 Probepvorbereitung, Messtechnik
 - 2.6.3 Temperaturabhängigkeit der relativen Viskosität von Synovia
 - 2.6.4 Thixotropie
 - 2.6.5 Viskosität von Synovia-Serum-Gemischen
 - 2.6.6 Vergleiche mit Literaturangaben

2.7 Brechungsindex (BI)

2.7.1 Brechungsindex von Synovia-Serum-Gemischen

2.8 Spezifisches Gewicht (SG)

3. RESULTATE

3.1 Versuch mit TMV-F

3.2 Viskositäts- und Brechungsindexverlauf nach Einsetzen einer Braunüle ohne Injektion einer fluoreszierenden Substanz

3.3 Fluoreszenzmessungen mit ESA-F

3.3.1 Sieben Versuche mit Pferden im Stehen

3.3.2 Sieben Versuche mit Pferden im Schritt

3.3.3 Versuch mit einem Pferd im Stehen nach 90 Min. Schritt

3.4 Viskositätsmessungen

3.4.1 Sieben Versuche mit Pferden im Stehen

3.4.2 Sieben Versuche mit Pferden im Schritt

3.5 Brechungsindex, spezifisches Gewicht

3.5.1 Sieben Versuche mit Pferden im Stehen

3.5.2 Sieben Versuche mit Pferden im Schritt

4. DISKUSSION

4.1 Fluoreszenzmessungen

4.1.1 Anfangsvolumen der Gelenke

4.1.2 Eliminationskonstante k von ESA-F

4.2 Viskositätsmessungen

4.3 Brechungsindex

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. BIBLIOGRAPHIE



1. EINLEITUNG

Sportpferde leiden sehr häufig an Gelenks- und Sehnenschäden. Dabei stellt sich die Frage, ob und wie weit diese Schäden zurückzuführen sind auf zu lange Stehperioden im Stall und auf zu kurzes tägliches Warmreiten vor Beginn des eigentlichen Leistungstrainings. Es wird davon ausgegangen, dass sich der ganze Körper - insbesondere die Extremitäten - nach spätestens einer Stunde Schritt der Belastung angepasst hat und auf ein Leistungstraining genügend vorbereitet ist. Das entspricht auch den Gepflogenheiten auf vielen Rennbahnen, wo die Pferde vor dem Leistungstraining während kurzer Zeit im Schritt eingearbeitet werden. Somit muss nach Parametern gesucht werden, welche sich während dieser Warmlaufzeit verändern und in ein neues Gleichgewicht übergehen. So könnte auf wissenschaftlicher Basis die durchschnittliche Zeitdauer angegeben werden, welche benötigt wird, um ein Pferd physiologisch auf eine anspruchsvolle Leistung vorzubereiten.

Persson (1971) zeigt bei vier Pferden im Zusammenhang mit 30-minütiger Arbeit im Trab eine Volumenzunahme der Gelenksflüssigkeit in klinisch gesunden Gelenken auf (Intercarpalgelenk und Sprunggelenk). Das Gelenkvolumen soll sich innert zwei Stunden nach Beendigung der Arbeit wieder auf den Anfangswert reduzieren (Ekman et al. (1974)). Es wurde die Annahme getroffen, dass die Eliminationsrate von 125 Jod-markiertem menschlichem Albumin aus dem Gelenk in Ruhe gleich gross sei wie in Bewegung der Pferde. Die Volumenzunahme wird als Folge eines Eindringes von Serum-Dyalisat ins Gelenk angesehen (Eisenmenger (1968)).

Daraus folgt, dass sich mit Arbeitsbeginn das Volumen der Gelenke vergrössern sollte. Gleichzeitig sollte sich auch die Zusammensetzung der Gelenksflüssigkeit kurzfristig verändern, im Sinne einer Erhöhung des Brechungsindex und einer Erniedrigung der relativen Viskosität (s. 2.6 und 2.7). In dieser Untersuchung wurden in vivo über eine Zeitspanne von 60 bis 100 Minuten Proben aus gesunden Fesselgelenken gewonnen. Es wurden Volumen, relative Viskosität und Brechungsindex der Synovia gemessen, um Unterschiede zwischen Pferden in Ruhe und denselben Pferden im Schritt festzustellen.

2. EXPERIMENTELLER TEIL UND MATERIAL

2.1 Versuchspferde und Versuchsanordnung

Die Versuche wurden an neun Pferden durchgeführt. Das Gewicht der einzelnen Pferde variierte zwischen 310 kg und 590 kg. Das Alter betrug 8 - 23 Jahre.

Die für die Versuche benötigten Gelenke zeigten:

- normales Aussehen der Synovia
- keine Ursachen für Schmerz oder Hinken
- keine sichtbare oder palpierbare Vergrößerung des Gelenksackes
- keine Verdickung der Gelenkscapsel

Folgende Messungen am Gelenk und an der Synovia wurden durchgeführt:

- Injektion einer bestimmten Menge fluoreszierender Substanz ins Gelenk. Messung der Verdünnung dieser Substanz zur Bestimmung des Gelenkvolumens und des Konzentrationsverlaufs mit der Zeit mittels Fluorometrie.
- Messung der relativen Viskosität der Synovia, um eine eventuelle Verdünnung mit Blutserum feststellen zu können.
- Messung des Brechungsindex der Synovia, um eine eventuelle Verdünnung mit Blutserum feststellen zu können.

Versuch in Ruhe:

Das Fesselgelenk der einen Vordergliedmasse diente für den Versuch in Ruhe. Nach Injektion der fluoreszierenden Substanz ins Gelenk wurden die Pferde während 5 Minuten im Schritt geführt, um eine homogene Verteilung dieser Substanz innerhalb des Gelenks zu erreichen. Dann wurden die Pferde stehen gelassen und alle 10 bis 15 Minuten eine Synoviaprobe entnommen. Die Versuchsdauer variierte zwischen 70 und 120 Minuten.

Versuch im Schritt:

Am anderen Fesselgelenk wurde ein Versuch mit den Pferden im Schritt durchgeführt. Der einzige Unterschied zum Versuch in Ruhe bestand darin, dass die Pferde während der ganzen Versuchsdauer im Schritt bewegt wurden.

2.2 Implantation eines Dauerkatheters ins Fesselgelenk

Aus folgenden Gründen musste ein permanenter, offener Zugang zu einem Gelenk gefunden werden:

- Bei mehrfacher Punktion eines Gelenks sind intraartikuläre Blutungen unvermeidbar. Diese Blutungen würden die Messungen stark beeinträchtigen.
- Eine einmal ins Gelenk gesteckte Injektionsnadel wird bei der Bewegung des Pferdes im Schritt herausgeschoben oder bewirkt starke Verletzungen zumindest der Synovialis mit starken intraartikulären Blutungen.

Als Gelenk mit einer Ausbuchtung in ein Gebiet möglichst wenig lokaler Bewegung wurde das Fesselgelenk (Art. metacarpophalangea, Scharniergelenk) gewählt. Der Recessus palmaris liegt zwischen dem M. interosseus medius und dem Röhrbein (Os metacarpale tertium), ca. 2 cm distal des Griffelbeinknöpfchens (Capitulum).

Die Implantation einer Braunüle (Best. Nr. LUER 420516, B. Braun Melsungen AG, BRD) in den Recessus palmaris wurde in Vollnarkose (Halothan, Lachgas, Sauerstoff) durchgeführt. Die Vordergliedmasse wurde unterhalb des Carpus abgebunden (Esmarch), um ein möglichst blutfreies Operationsfeld zu erhalten.

Vom Griffelbeinknöpfchen aus nach distal wurde ein 3 - 5 cm langer Hautschnitt gemacht (Abb. 1). Dieser liegt somit über dem Gebiet, in welchem sich der Recessus palmaris des Fesselgelenks befindet. Ein zweiter, kleinerer Schnitt wurde einige cm proximal angebracht. Die Gelenkscapsel wurde mit der Schere freipräpariert und mit zwei Pinzetten angehoben. Nun wurde die Braunüle durch den proximalen Hautschnitt eingeführt, mit einem Péan subcutan in distaler Richtung gezogen und zwischen den zwei Pinzetten durch die Gelenkscapsel hindurch in die Gelenkshöhle geschoben (Abb. 2).

Mit zwei zirkulären Nähten wurde die Braunüle in der Subcutis proximal des Einstichs ins Gelenk befestigt. Eine weitere Befestigung wurde am Kopf der Braunüle angebracht, um ein Zurückgleiten zu verhindern.

Anschliessend wurde die distale Wunde subcutan fortlaufend und cutan mit Einzelknopfnähten geschlossen.

Um das Ausreissen der Braunüle im postnarkotischen Exzitationsstadium und beim Aufstehen der Pferde zusätzlich zu erschweren, wurde ein dicker Watteverband und eine Kunststoffschiene vom Huf bis zum Carpus angelegt.

Abb. 1:

Hautschnitte

- A proximaler Hautschnitt
- B distaler Hautschnitt
- 1. Griffelbeinknöpfchen
- 2. Röhrbein
- 3. M. interosseus
- 4. plantare Ausbuchtung des Fesselgelenks

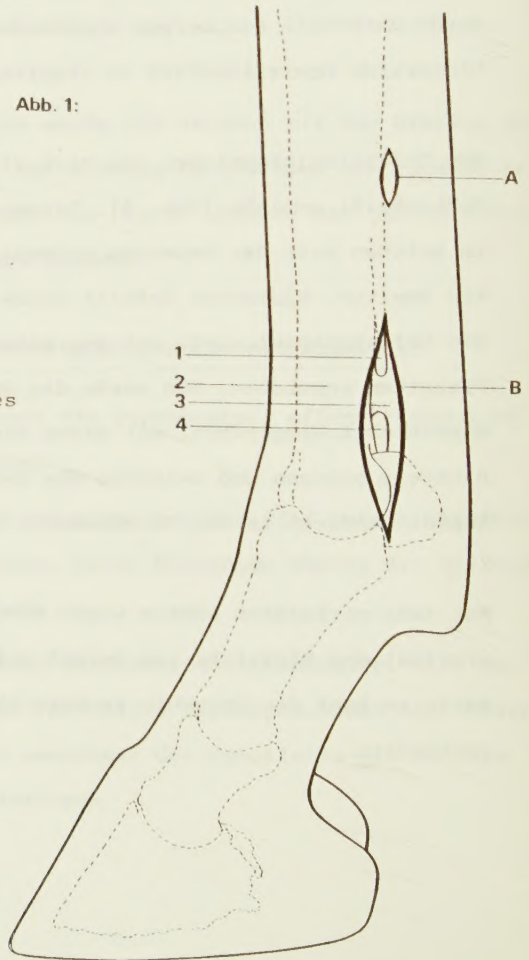
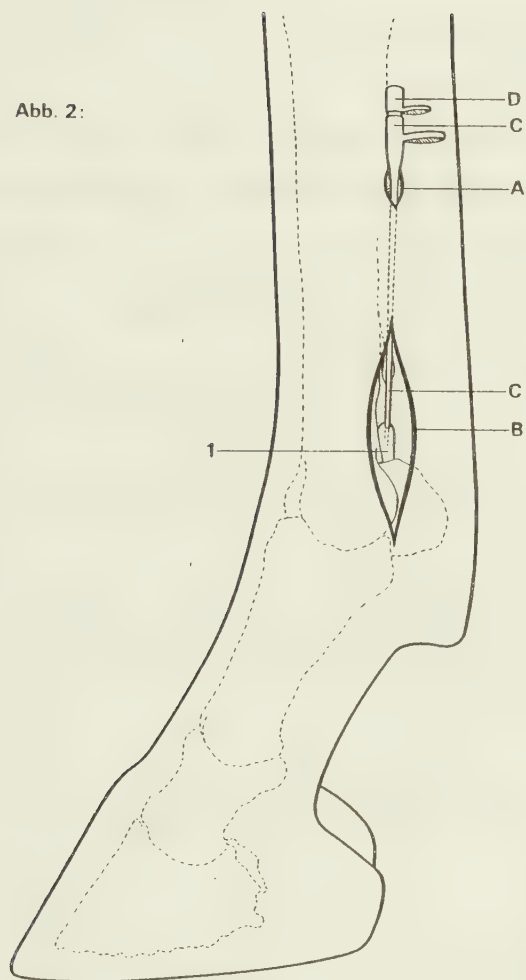


Abb. 2:



Position der Braunüle

- A proximaler Hautschnitt
- B distaler Hautschnitt
- C Braunüle ins Gelenk eingestochen

- D Mandrin
- 1 plantare Ausbuchtung des Fesselgelenks

2.3 Probeentnahmen und intraartikuläre Injektionen durch die Braunüle

Dank der intraartikulären Braunüle konnten die Proben ohne zusätzliche Traumatisierung des Gelenkes direkt aus dem Gelenksack entnommen und die Markiersubstanzen direkt in den Gelenksack injiziert werden. Dazu wurde einer Injektionsnadel (0.7 x 32 mm) die Spitze abgeschnitten und ein ca. 12 cm langes Stück Nyhlonschlauch darübergestülpt (Portex Nylon Tubing Size 1 x 100 ft., Fa. Laubscher A.G., Basel). Mit diesem Schlauch, auf eine 2 ml Spritze aufgesetzt, wurde durch die implantierte Braunüle hindurch direkt ins Gelenk eingegangen zwecks Injektion bzw. Probeentnahme (Abb. 3)

Die Probemenge betrug jeweils ca. 0,5 ml. Die Proben wurden bei 4° C in Eppendorf-Röhrchen aufbewahrt. Sämtliche Messungen wurden innert 24 Std. durchgeführt.

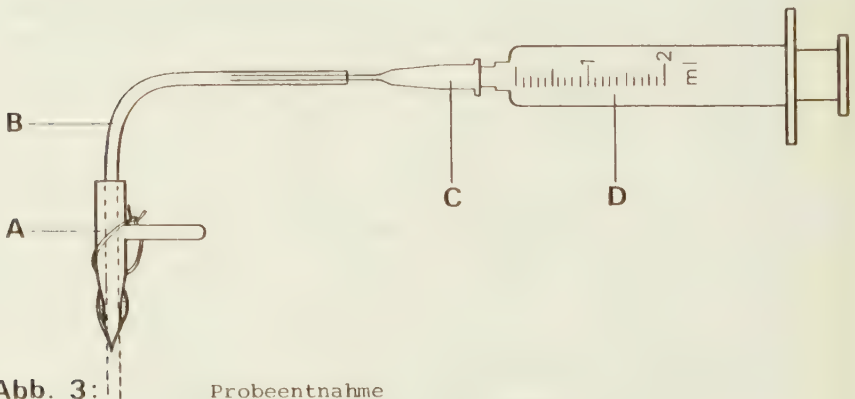


Abb. 3: Probeentnahme

- A Braunüle in Position fixiert
- B Portex Nyhlonschlauch
- C Injektionsnadel mit abgeschnittener Spitze
- D 2 ml Spritze

2.4 Fluoreszenzmessungen

2.4.1 Apparatur

Die Fluoreszenz der Proben wurde auf einem Aminco-Bowman Spectrofluorometer der Firma Kontron gemessen.

Einstellungen: Slits:	1.0 mm
Reference lamp:	1.0

2.4.2 Eigenschaften der Synovia

Im Bereich des Exzitations- und Emissionsmaximums (395 nm bzw. 470 nm) von ESA-F wurde eine geringe Eigenfluoreszenz der Gelenksflüssigkeit beobachtet. Sie war von Probe zu Probe verschieden intensiv, wobei die stärkste Eigenfluoreszenz etwa doppelt so gross war wie die niedrigste. Das Exzitationsmaximum lag bei 360 nm, das Emissionsmaximum bei 425 nm. Die Intensität dieser Eigenfluoreszenz war zwischen pH 5 und pH 10 gleich gross und stabil. Sie war nicht auf einen Detergentien-Effekt durch Kontakt mit den Spritzen zurückzuführen.

2.4.3 Herstellung der Proben

Um mit möglichst wenig Synovia messen zu können und dennoch eine genügende Menge Messflüssigkeit zu erhalten, wurden 200 µl Synovia mit 1'000 µl dest. Wasser verdünnt. Die Fluoreszenz dieser verdünnten Lösung wurde gemessen und die darin enthaltene Menge ESA-F auf 1 ml reine Synovia zurückberechnet.

2.4.4 Messprinzip

Referenzprobe: Vor der Injektion von ESA-F ins Gelenk wurde eine Probe Synovia entnommen. Diese Leerprobe wurde mit verschiedenen Mengen ESA-F versetzt und ein Diagramm relative Fluoreszenz gegen ESA-F Konzentration aufgenommen.

Exzitation: 395 nm

Emission: 470 nm

Messprobe: Für die Messproben - zu bestimmten Zeiten nach der Injektion von ESA-F aus dem Gelenk entnommen - wurde jeweils die relative Fluoreszenz gemessen. Aus obigem Diagramm konnte die ESA-F Konzentration berechnet werden. Ein Diagramm ESA-F Konzentration gegen die Zeit wurde aufgezeichnet. Durch Extrapolation auf die Zeit Null (Zeitpunkt der Injektion) konnte das Anfangsvolumen des Gelenksacks bestimmt werden. Es wurde auch auf Unterschiede zwischen den Versuchen in Ruhe und den Versuchen im Schritt geachtet.

2.4.5 Auswertung der Kurven

Für das Diagramm relative Fluoreszenz gegen ESA-F Konzentration erwies sich der Ansatz $y = ax + b$ als geeignet. Für das Diagramm ESA-F Konzentration gegen die Zeit erwies sich der Ansatz $y = y_0 e^{-kt}$ als geeignet (vgl. auch Peterson (1971)). In zwei zufällig herausgegriffenen Versuchen wurde eine Volumenkorrektur bezüglich der entnommenen Probenmengen durchgeführt. Diese wirkte sich jedoch nur unwesentlich auf das Endergebnis aus. Deshalb konnte im weiteren auf eine Volumenkorrektur verzichtet werden.

2.5 Substanzen zur Messung der intraartikulären Verdünnung (Volumenbestimmung)

2.5.1 Tabakmosaikvirus (TMV) mit Fluoreskamin umgesetzt (TMV-F)

Es wurde nach einer Partikel gesucht, welche nicht aus dem Gelenk diffundieren, aber dennoch mit fluoreszierendem Farbstoff umgesetzt werden kann. Die Permeationsgrenze der Synovialis liegt bei einem Molekulargewicht (MG) von ca. 160'000 (Poncet (1976)). TMV wurde nach der Methode von von Wechmar et al. (1970) gereinigt und bei pH 8 (Phosphatpuffer) mit Fluram (Hoffmann-La Roche Inc., Basel) umgesetzt (de Bernardo et al. (1974)). Exzitation: 402 nm, Emission: 474 nm. Die fluoreszierende Virus-Suspension war bei 4° C über 10 Tage stabil und zeigte von pH 6 bis 10 keine Unterschiede der relativen Fluoreszenz.

2.5.2 Bovines Serum Albumin (BSA) mit Fluoreskamin umgesetzt (BSA-F)

Ausgangsmaterialien waren Bovines Serum Albumin Fraktion V A-4503 der Firma Sigma und Fluram (Hoffmann-La Roche Inc., Basel). BSA-F wurde in Abänderung der Anleitung von de Bernardo et al. (1974) folgendermassen hergestellt: Glaswaren in 35% Salpetersäure kochen. 200 mg BSA (MG 68'000) in 4 ml 0.05 M Phosphat-Puffer pH 8.5 mit 2 mg Fluoreskamin (MG 278.3, 0.004 M) in 4 ml Dioxan zusammengeben, ca. 15 Sek. rühren und nach 1 Min. auf pH 7.5 neutralisieren. Dialysieren gegen 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.5 und anschliessend lyophilisieren. Vor Gebrauch BSA-F in physiologischer NaCl-Lösung auflösen (3 mg/ml) und während 2 Std. bei 56° C halten, um Unverträglichkeitserscheinungen im Gelenk zu vermeiden (Persson (1971)).

Exzitation: 395 nm, Emission: 482 nm. Die Lösung war bei 4° C über mehrere Tage stabil und zeigte zwischen pH 6 und pH 8.5 keine Unterschiede der relativen Fluoreszenz.

2.5.3 Equines Serum Albumin (ESA) mit Fluoreskamin umgesetzt (ESA-F)

Ausgangsmaterialien waren Fluram (Hoffmann-La Roche Inc., Basel) und Equines Serum Albumin, gewonnen nach Travis und Pannell (1973), Travis et al. (1976). Die Fraktionen enthielten geringe Mengen an Lipoprotein-Verunreinigungen (Wille (1976)), wurden mit Millipore-Membranen aufkonzentriert und mittels Gel-Chromatographie auf Einheitlichkeit geprüft. Die chemische Kopplung, Lyophilisierung und Probeprobereitung erfolgte wie beim Bovinen Serum Albumin (Kap. 2.5.2). Exzitation: 395 nm, Emission: 470 nm. Die Lösung war bei 4° C über mehrere Tage stabil und zeigte zwischen pH 6 und 8.5 keine Unterschiede der relativen Fluoreszenz. Diese Substanz erwies sich für die Versuche am geeignetsten und wurde deshalb für die Hauptversuche eingesetzt.

2.5.4 Bovines Serum Albumin (BSA) mit Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat, Isomer R umgesetzt (BSA-RITC)

Ausgangsmaterialien waren Bovines Albumin Fraktion V A-4503 der Firma Sigma und Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat, Isomer R der Firma Becton Dickinson AG, Basel. BSA wurde mit RITC folgendermassen gekoppelt (Angabe von R. Wunderlin, Diplomand am Inst. für Molekularbiologie, Höggerberg):

Zu 100 mg BSA in 10 ml Carbonat-Puffer (0.05 M, pH 9.5) wurden 5 mg RITC (MG 460) in 2 ml Dimethylsulfoxid gegeben. Die Kopplung wurde zuerst 1.5 Std. bei 37° C, dann 1.5 Std. bei 56° C durchgeführt. Die Lösung wurde auf das halbe Volumen eingedampft (Rotvap) und das freie RITC mittels Säulenchromatographie (Sephadex G 75) vom BSA-RITC abgetrennt. Das BSA-RITC wurde anschliessend sterilfiltriert und auf 20 ml eingedampft.

Exzitation 554 nm, Emission: 574 nm.

Der Vorteil von RITC markiertem Albumin wäre in der etwa 100-mal grösseren relativen Fluoreszenz gegenüber einer gleichen Konzentration von Fluoreskamin markiertem Albumin. Ebenfalls vorteilhaft wäre die fehlende Eigenfluoreszenz von Synovia in diesem Wellenbereich (siehe Kapitel 2.4.2). Allerdings werden durch Bestandteile der Synovia die nahe zusammenliegenden Exzitations- und Emissionsspektren stark verbreitert. Dadurch wird Albumin-RITC für die Bestimmung des Gelenkvolumens zu ungenau, das heisst: praktisch unbrauchbar.

2.6. Viskositätsmessungen

2.6.1 Apparatur (Abb. 4)

Es wurde ein Kugelfallviskosimeter verwendet. Dieses erlaubt die Berechnung der Viskosität aus der Geschwindigkeit, mit der eine Kugel durch eine flüssigkeitsgefüllte Glaskapillare fällt. Auf einer 7 cm langen Glaskapillare mit Innendurchmesser 1.10 mm wurden im Abstand von je 2 cm von der Mitte eine Farbmarkierung angebracht.

Die Kapillare wurde in ein Mantelrohr eingepasst, das mit Wasser konstanter Temperatur durchströmt wurde. Die ganze Apparatur wurde in eine Spannvorrichtung geklemmt, um das Auslaufen der Messflüssigkeit und das Eindringen von Luftblasen zu verhindern.

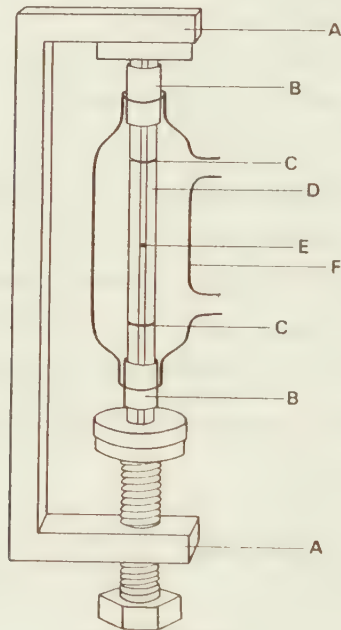


Abb. 4:

Kugelfallviskosimeter

- A Spannvorrichtung zum Verschliessen der Kapillare
- B Gummimanschetten
- C Farbmarkierungen auf der Glaskapillare
- D Glaskapillare
- E Stahlkugel fallend
- F Mantelrohr mit Ein- und Auslasstutzen für das thermostatierte Wasser

2.6.2 Probenvorbereitung, Messtechnik

Die Proben wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge 5412 während 5 Min. zentrifugiert. So wurden Zellbestandteile eliminiert, welche die Stahlkugeln im Kapillarlumen hätten verkeilen können. Die Probenflüssigkeit (80 - 100 µl) wurde in die Kapillare eingefüllt und die Fallzeit einer zugesetzten Stahlkugel von 1.00 mm Durchmesser mit einer Stoppuhr gemessen. Es wurde das Mittel über mindestens 10 Messungen gebildet. Mit jeweils derselben Kugel wurden noch die durchschnittlichen Fallzeiten für dest. Wasser ermittelt.

$$\text{Relative Viskosität} = \frac{\eta_{\text{syn}}}{\eta_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{t_{\text{syn}}}{t_{\text{H}_2\text{O}}} \quad \eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1$$

2.6.3 Temperaturabhängigkeit der relativen Viskosität von Synovia

Vorversuche ergaben, dass die Viskosität von Synovia im Bereich von 20 bis 60° C eine starke Temperaturabhängigkeit zeigt (Abb. 5). Dies stimmt mit früheren Resultaten von Eisenmenger (1968) und Siegenthaler (1976) überein. Deshalb wurden alle Messungen bei 37.5° C durchgeführt.

2.6.4 Thixotropie

Bei einer thixotropen, also nicht Newton'schen Flüssigkeit ist die Viskosität auch von der Eigenbewegung der Flüssigkeit selbst abhängig (Eisenmenger (1968), Siegenthaler (1976)). Zwischen den ersten und den letzten Viskositätsmessungen einer Probe konnte mit dieser Methode kein signifikanter Unterschied in den Fallzeiten der Kugel festgestellt werden. Demnach verhält sich Synovia in diesem Messsystem wie eine Newton'sche Flüssigkeit; sie zeigt keine Thixotropie.

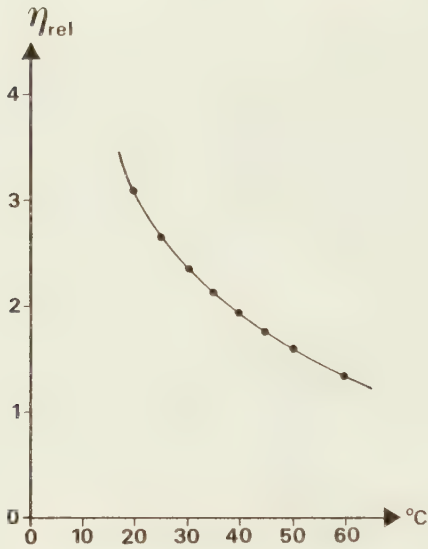


Abb. 5:

Relative Viskosität (η_{rel}) von Synovia in Abhängigkeit der Temperatur ($^{\circ}$ C)

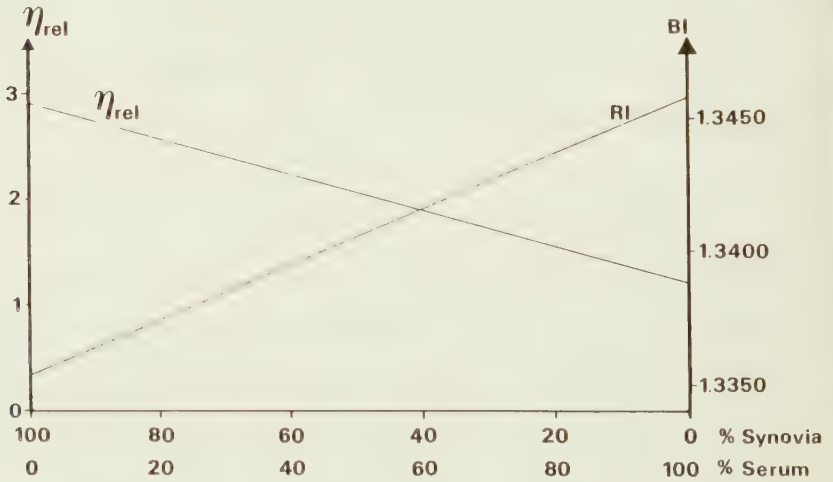


Abb. 6:

Relative Viskosität (η_{rel}) und Brechungsindex (BI) von Synovia-Serum-Gemischen

2.6.5 Viskosität von Synovia-Serum-Gemischen

Synovia und Pferdeserum wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und die Viskosität gemessen. Die Viskosität von Synovia nimmt mit zunehmender Beimischung von Serum linear ab (Abb. 6).

2.6.6 Vergleiche mit Literaturangaben

Van Pelt (1962) fand bei 8 Proben von Synovia aus dem vorderen Fesselgelenk eine relative Viskosität im Bereich zwischen 2.77 - 67.78. Die Viskosität ist höher im Alter, bei kleinen und bei ruhenden Gelenken (Eisenmenger (1968)). Bei 0° C ändert sich die Viskosität während einiger Wochen nicht (Jebens (1959)).

2.7 Brechungsindex (BI)

Der Brechungsindex wurde mit einem Refraktometer bei 37.5° C gemessen.

2.7.1 Brechungsindex von Synovia-Serum-Gemischen

Synovia und Pferdeserum wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und der Brechungsindex gemessen. Der Brechungsindex von Synovia nimmt mit zunehmender Beimischung von Serum linear zu (Abb. 6).

2.8 Spezifisches Gewicht (SG)

Das spezifische Gewicht von 10 verschiedenen Proben wurde mit einem Pyknometer bei Raumtemperatur gemessen. Folgende lineare Abhängigkeit zum Brechungsindex wurde gefunden:

$$(BI) = 0.69 (SG) + 0.64$$

Korrelationskoeffizient $r = 0.99$

Es wurde keine signifikante Beziehung zwischen SG und Viskosität gefunden. Damit decken sich meine Befunde mit denjenigen von Eisenmenger (1968).

3. RESULTATE

3.1 Versuch mit TMV-F

Nach Injektion von TMV-F ins Sprunggelenk mit einer Injektionsnadel wurden an der Synovia elektronenmikroskopische Aufnahmen, Leukozyten-Zählungen, Differenzierung von Leukozyten und Fluoreszenzmessungen gemacht:

Zeit nach Injektion	EM	Lc/mm ³	Differenzierung	Fluoreszenz
30 Min.	viele TMV	375	-----	100 %
3 Std.	weniger TMV	1000	95% neu.Gran.	75 %
20 Std.	keine TMV	12450	68% neu.Gran. 20% Monozyten + Makrophagen	0 %

Vermutlich wurden die TMV von Monozyten und Makrophagen phagozytiert. Somit kann der grosse Vorteil, dass TMV nicht permeiert, nicht ausgenutzt werden.

3.2 Viskositäts- und Brechungsindexverlauf nach Einsetzen einer Braunüle ohne Injektion einer fluoreszierenden Substanz

Um in vivo den Einfluss einer über längere Zeit eingelegten Braunüle zu prüfen, wurden während 28 Std. die Erythrozytenzahl, die Leukozytenzahl, die Viskosität und der Brechungsindex der Synovia gemessen (Abb. 7). In den ersten zwei Proben wurden vereinzelt Erythrozyten gefunden, und die Leukozytenzahl blieb innerhalb der Norm von 100 Lc/mm³ (Persson (1971)).

Die Viskosität nimmt innerhalb der ersten 6 bis 8 Stunden stark ab, um dann langsam wieder dem ursprünglichen Wert zuzustreben. Der Brechungsindex bleibt sehr konstant. Die nach unserer Methode eingesetzte Braunüle erzeugt also weder eine intraartikuläre Blutung infolge Traumatisierung der Gelenkstrukturen noch eine eitrige Entzündung infolge eines nicht auszuschliessenden Eindringens von toten oder lebenden Partikeln ins Gelenk bei den Probeentnahmen.

Es kann lediglich eine langsame Veränderung der Viskosität der Synovia beobachtet werden, welche möglicherweise auf eine Veränderung (Depolymerisierung) von Synoviabestandteilen zurückzuführen ist. Die Entstehung einer serösen Gelenksentzündung kann wegen des sehr konstant bleibenden Brechungsindex mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

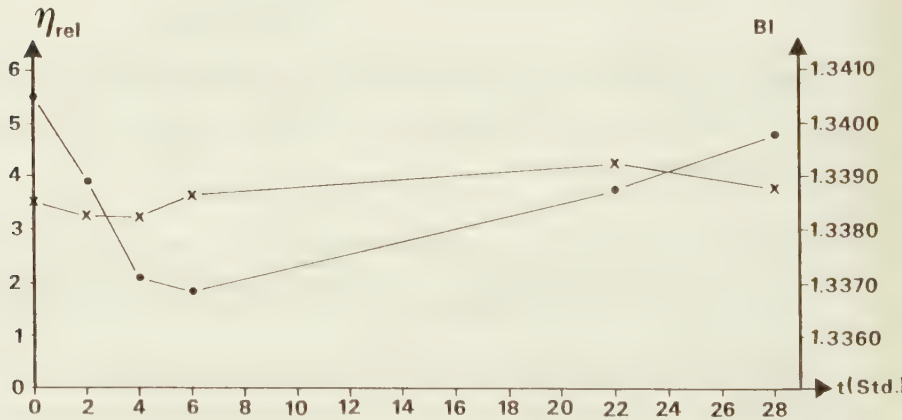


Abb. 7:

Relative Viskosität (η_{rel} -•-) und Brechungsindex (BI -x-) in Abhängigkeit der Zeit nach Einsetzen der Braunüle ins Gelenk ohne Injektion einer fluoreszierenden Substanz

3.3 Fluoreszenzmessungen mit ESA-F

Um den Einfluss der Bewegung im Schritt auf die Fesselgelenke bei Pferden zu untersuchen, wurde nach den Anfangsvolumina der Synovia in den Gelenken, sowie nach Volumenänderungen und Art der Volumenänderungen gesucht. Zu diesem Zweck wurde nach der Injektion einer definierten Menge ESA-F ins Gelenk die Verdünnung und der Verlauf der Verdünnung mit der Zeit gemessen.

3.3.1 Sieben Versuche mit Pferden im Stehen

Abb. 8 zeigt in halblogarithmischer Darstellung das Diagramm relative Konzentration von ESA-F gegen die Zeit nach Injektion ins Gelenk. Es wurden sieben Versuche gemacht. Die Auswertung nach der Funktion $y = y_0 e^{-kt}$ brachte folgende Ergebnisse:

$$\bar{k} = 0.0127 \quad (\text{SD} = 0.0041)$$

$$\bar{y}_0 = 19.6 \quad (\text{SD} = 3.9)$$

$$\bar{r} = 0.969 \quad (\text{SD} = 0.062)$$

$$\bar{v}_0 = \frac{1000}{6 \bar{y}_0} = 9.8 \text{ ml} \quad (\text{SD} = 1.7)$$

y = relative Konzentration von ESA-F in der Synovia k = Eliminationskonstante

y_0 = Konzentration zur Zeit $t = 0$ (Zeitpunkt der Injektion) r = Korrelationskoeffizient

t = Zeit in Minuten nach der Injektion von ESA-F v_0 = Volumen des Gelenkinhalts zur Zeit $t = 0$ (Zeitpunkt der Injektion)

$1000/6$ = Verdünnungsfaktor

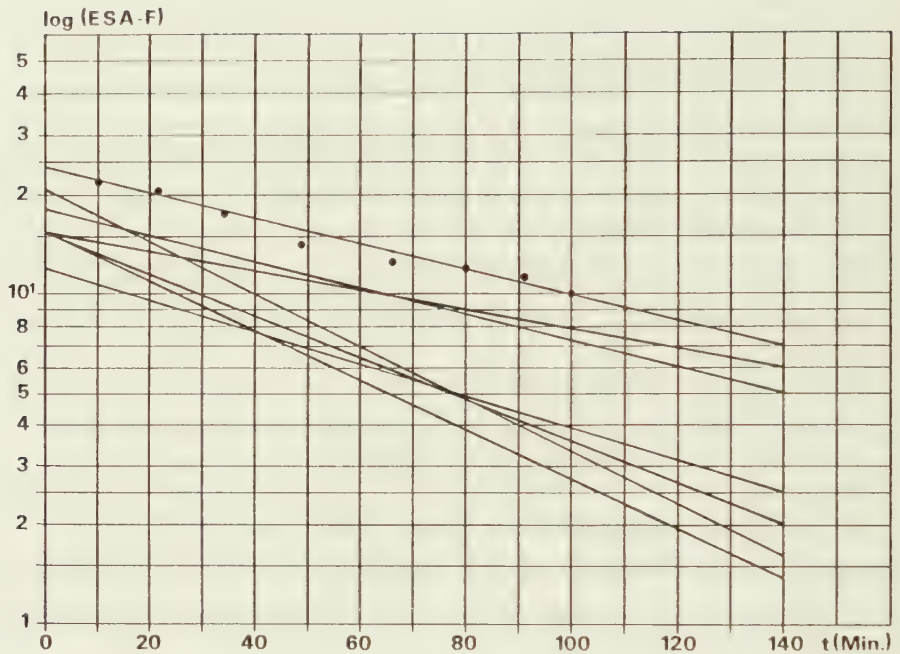


Abb. 8: Relative Konzentration von ESA-F in Abhängigkeit der Zeit für die Versuche im Stehen (oberste Kurve mit typischer Position der einzelnen Messpunkte)

3.3.2 Sieben Versuche mit Pferden im Schritt

Abb. 9 entspricht darstellungsmässig der Abb. 8, aber für die Versuche im Schritt. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.3.1.

$$\bar{k} = 0.0213 \quad (\text{SD} = 0.0040)$$

$$\bar{y}_0 = 20.2 \quad (\text{SD} = 8.2)$$

$$\bar{r} = 0.973 \quad (\text{SD} = 0.040)$$

$$\bar{v}_0 = 8.4 \text{ ml} \quad (\text{SD} = 4.2)$$

v_0 = Volumen des Gelenkinhalts zum Zeitpunkt der Injektion, d.h. vor Bewegungsbeginn

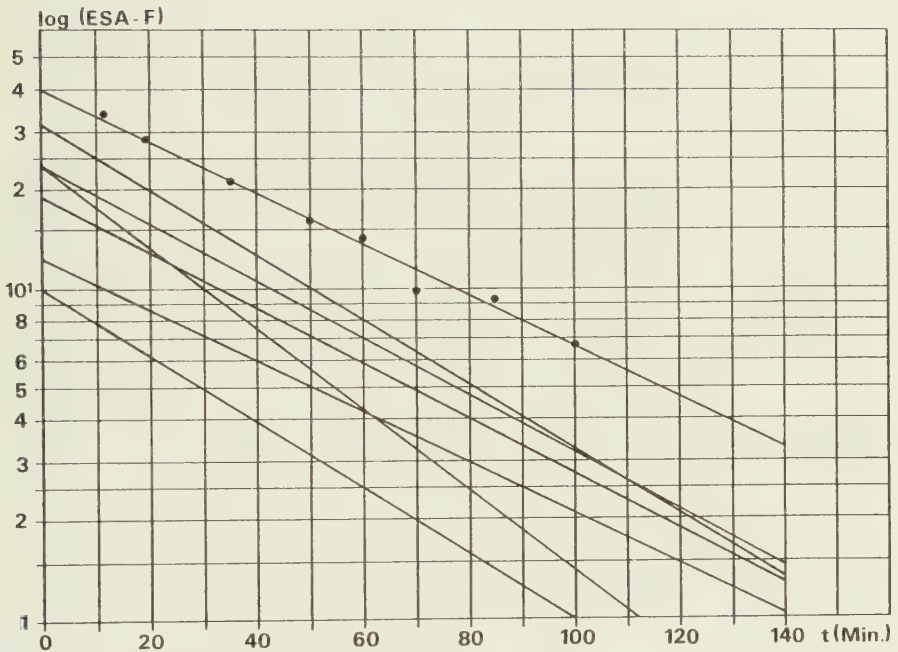


Abb. 9: Relative Konzentration von ESA-F in Abhängigkeit der Zeit für die Versuche im Schritt (oberste Kurve mit typischer Position der einzelnen Messpunkte)

3.3.3 Versuch mit einem Pferd im Stehen nach 90 Min. Schritt

Ein Versuchspferd wurde zuerst während 90 Min. im Schritt geführt. Anschliessend wurde ein Versuch im Stehen gemacht. Der Versuch wurde wie unter 3.3.1 ausgewertet.

$$k = 0.0138$$

$$y_0 = 23.4$$

$$v_0 = 7.1 \text{ ml}$$

$$V_0 = \text{Volumen des Gelenkinhalts zur Zeit der Injektion, die nach 90 Min. Schritt gemacht wurde.}$$

3.4 Viskositätsmessungen

3.4.1 Sieben Versuche mit Pferden im Stehen

Abb. 10 zeigt den Verlauf der relativen Viskosität der Synovia. Zur besseren Uebersicht wurde die Anfangsviskosität (nach Injektion von ESA-F) als 100 % genommen und der zeitliche Verlauf prozentual angegeben. Die durchschnittliche relative Viskosität vor Beginn der Versuche lag im Bereich von 1.5 - 17. Die Werte lagen nach 40 Min. bei 84.3 % (SD = 7.0 %) und nach 60 Min. bei 74.4 % (SD = 13.8 %). Die relative Viskosität wurde durch die Injektion von 1 ml ESA-F Lösung um 5 bis 15 % herabgesetzt.

3.4.2 Sieben Versuche mit Pferden im Schritt

Abb. 11 zeigt den Verlauf der relativen Viskosität der Synovia (gleiche Darstellung wie Abb. 10). Die durchschnittliche relative Viskosität vor Beginn der Versuche lag im Bereich von 1.4 - 15). Die Werte lagen nach 40 Min. bei 93.7 % (SD = 9.0 %) und nach 60 Min. bei 89.1 % (SD = 10.5 %).

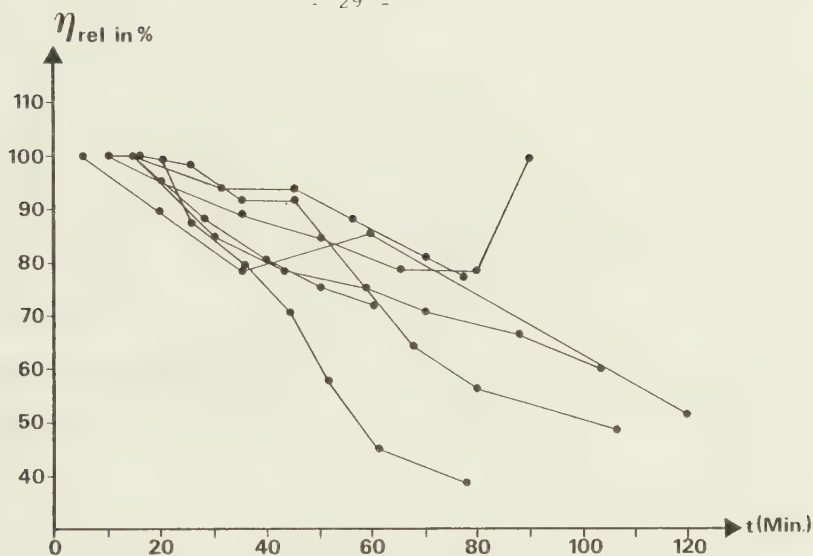


Abb. 10:

Relative Viskosität η_{rel} in Prozent der Viskosität bei Versuchsbeginn in Abhängigkeit der Zeit t für die Versuche im Stehen

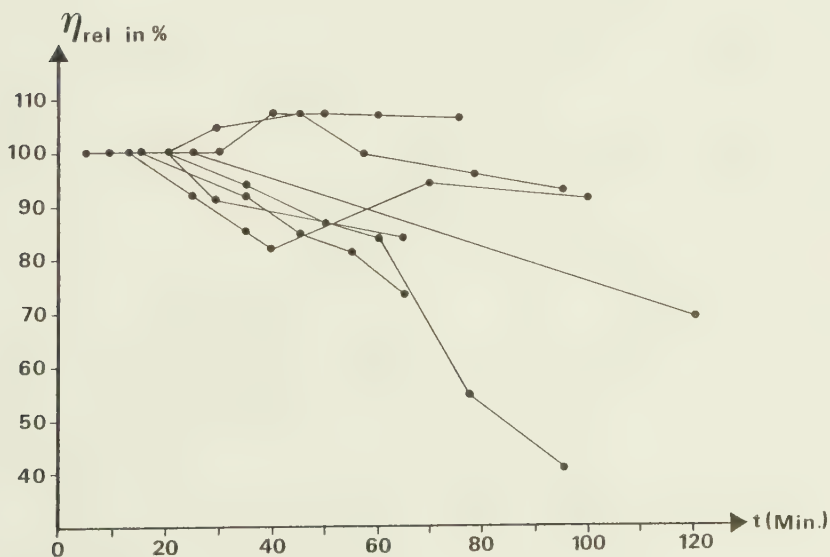


Abb. 11

Relative Viskosität η_{rel} in Prozent der Viskosität bei Versuchsbeginn in Abhängigkeit der Zeit t für die Versuche im Schritt

3.5 Brechungsindex, spezifisches Gewicht

3.5.1 Sieben Versuche mit Pferden im Stehen

Abb. 12 zeigt den Verlauf des Brechungsindex der Synovia. Zur besseren Uebersicht wurde der Brechungsindex zu Beginn der Versuche als 100 % genommen und der zeitliche Verlauf der dritten und vierten Stelle nach dem Komma prozentual angegeben. Der durchschnittliche Brechungsindex (100 %) vor Beginn der Versuche war 1.3375 (SD = 0.0016, Bereich 1.3351 - 1.3397). Nach 60 Min. lag der Durchschnitt bei 103.3 % (SD = 6.6 %). Aufgrund der durchgeführten Eichungen (Kapitel 2.8) entspricht dies einem spezifischen Gewicht von 1.0109 g/ml (SD = 0.0023 g/ml).

3.5.2 Sieben Versuche mit Pferden im Schritt

Abb. 13 zeigt den Verlauf des Brechungsindex der Synovia (gleiche Darstellung wie Abb. 12). Der durchschnittliche Brechungsindex (100 %) vor Beginn der Versuche war 1.3365 (SD = 0.0025, Bereich 1.3347 - 1.3412). Nach 60 Min. lag der Durchschnitt bei 105.29 % (SD = 11.8 %). Das entspricht einem spezifischen Gewicht von 1.0094 g/ml (SD = 0.0036 g/ml).

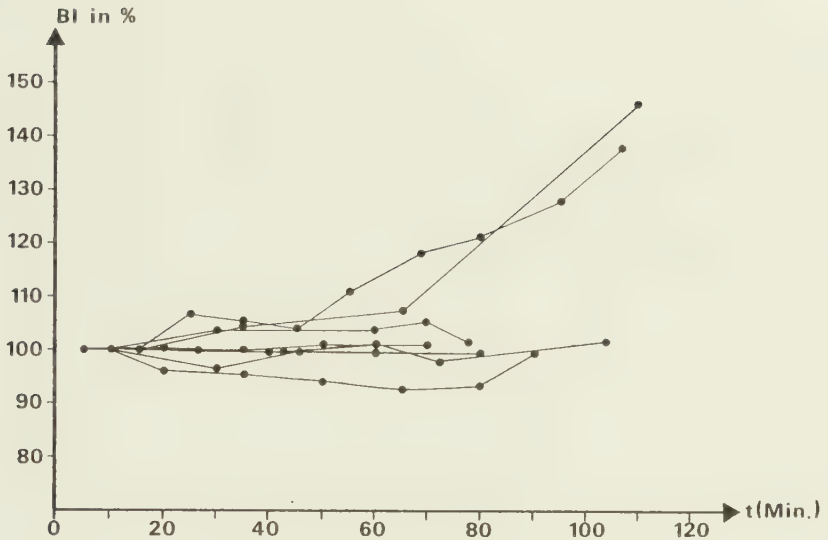


Abb. 12:

Brechungsindex BI (3. und 4. Stelle nach dem Komma) in Prozent des Brechungsindex bei Versuchsbeginn in Abhängigkeit der Zeit für die Versuche im Stehen

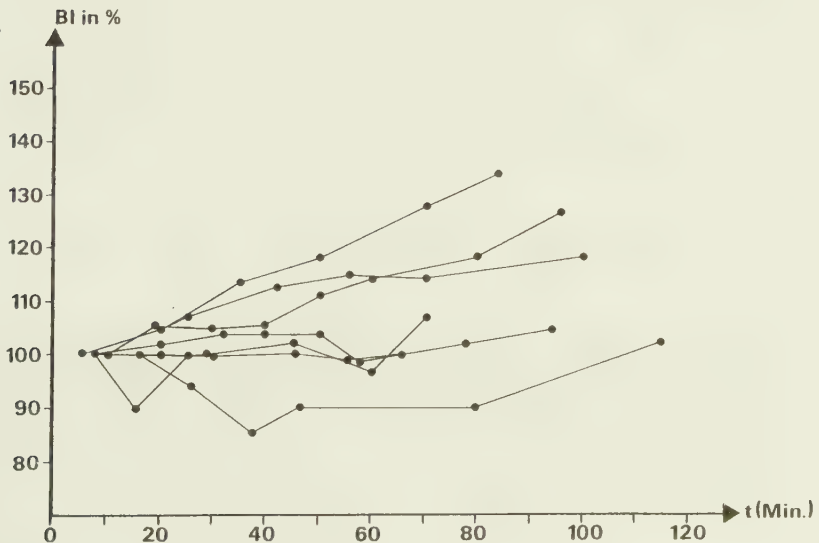


Abb. 13:

Brechungsindex BI (3. und 4. Stelle nach dem Komma) in Prozent des Brechungsindex bei Versuchsbeginn in Abhängigkeit der Zeit für die Versuche im Schritt

4. DISKUSSION

Diese Arbeit wurde durchgeführt mit dem Ziel, die zeitliche Abhängigkeit eventueller Veränderungen des Gelenkvolumens und der Zusammensetzung von Synovia während des Warmlaufens von Pferden zu eruieren. Persson (1971) zeigt bei vier Pferden nach 30-minütiger Arbeit im Trab eine Volumenzunahme von 15.5 % (Bereich 3.8 bis 26.5 %) im Sprunggelenk und von 9.5 % (Bereich 1.3 bis 22 %) im Interkarpalgelenk nach. Allerdings ist die Streuung dieser Resultate ausserordentlich gross. Ebenfalls wurde angenommen, dass die Eliminationskonstante k von 125 Jod-markiertem menschlichem Albumin aus dem Gelenk in Ruhe gleich gross sei, wie in Bewegung der Pferde. Eisenmenger (1961) vermutet ein Eindringen von Serum-Dialysat ins Gelenk bei der Bewegung der Pferde.

Die Problematik wurde mit den Methoden der Verdünnung einer fluoreszierenden Substanz (Volumenbestimmung), der Viskosität und des Brechungsindex (Eindringen von Serum) angegangen.

4.1 Fluoreszenzmessungen

4.1.1 Anfangsvolumen der Gelenke

Bei einem schnellen Mechanismus der Volumenerhöhung in den ersten Minuten nach Beginn der Bewegung im Schritt würden sich Unterschiede in den durch Extrapolation errechneten Anfangsvolumina beider Versuchsreihen ergeben.

Das extrapolierte Anfangsvolumen müsste für die Versuche im Schritt grösser sein als für die Versuche in Ruhe. Abb. 14 zeigt den Kurvenverlauf (Konzentration von ESA-F im Gelenk gegen die Zeit, halblogarithmische Darstellung) unter der Annahme einer Volumenveränderung innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Bewegung der Pferde.

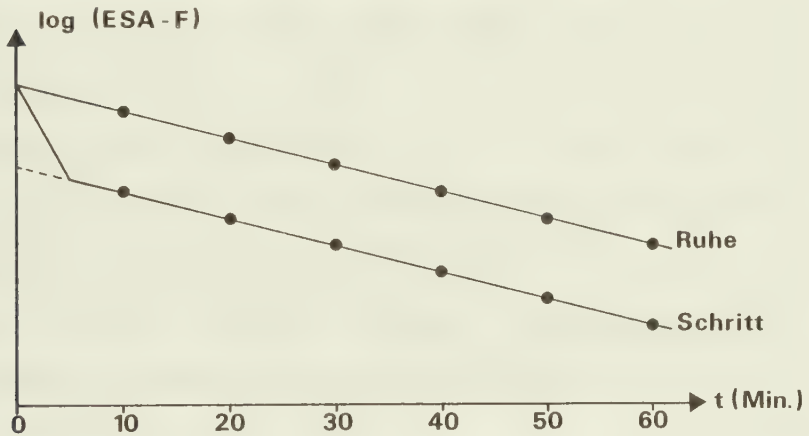


Abb. 14

Hypothetischer Kurvenverlauf (Konzentration von ESA-F gegen die Zeit t) bei einer raschen Volumenänderung innerhalb der ersten Minuten

———— effektiver Kurvenverlauf
 - - - - - Extrapolation auf $t = 0$

Anhand des Konzentrationsverlaufs von ESA-F im Gelenk wurde durch Extrapolation auf die Zeit Null der Injektion das Anfangsvolumen der Gelenksinhalte berechnet (vgl. auch Persson (1971), Smith (1979)).

Dieser Extrapolationswert für die Versuche im Schritt (8.4 ± 4.2 ml) ist nicht signifikant verschieden von demjenigen für die Versuche in Ruhe (9.8 ± 1.7 ml). Daraus kann geschlossen werden, dass innerhalb der Streuungsgrenzen kein schneller Mechanismus der Volumenerhöhung in den ersten Minuten nach Beginn der Bewegung im Schritt stattfindet.

4.1.2 Eliminationskonstante k von ESA-F

Die Eliminationskonstante k ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Elimination von ESA-F aus dem Gelenk und die Volumenzunahme innerhalb des Gelenkes. Eine langsame Volumenzunahme über eine Zeit von bis zu 45 Min. müsste eine signifikante Störung der Exponentialfunktion ergeben. Diese Störung würde sich sowohl auf die Eliminationskonstante (Erhöhung des Betrags) als auch insbesondere auf den Korrelationskoeffizient r (Erniedrigung des Betrags) auswirken.

Abb. 15 zeigt den hypothetischen Kurvenverlauf (gleiche Darstellung wie Abb. 14) bei einer langsamen Volumenveränderung innerhalb von 35 Min. nach Beginn der Bewegung der Pferde. Eine solche Störung konnte innerhalb der Streuungsbreite weder bestätigt noch verworfen werden. Allerdings liegt die Kurvengüte r für die Versuche im Schritt ($r = 0.973$) und im Stehen ($r = 0.969$) in der gleichen Grösse. Man ist deshalb geneigt, eine solche Störung eher zu verneinen. Das würde bedeuten, dass sich das Volumen der Fesselgelenke während des Trainings im Schritt möglicherweise gar nicht oder nur unwesentlich verändert.

Die signifikant höhere Eliminationsrate von ESA-F bei den Versuchen im Schritt (vgl. Abb. 8 und 9) ist möglicherweise auf eine bessere Umwälzung der relativ zähen Gelenksflüssigkeit innerhalb des Gelenkes zurückzuführen. Die fluoreszierenden Albuminmoleküle haben damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an die Synovialis zu gelangen und dort aus dem Gelenk entfernt zu werden. Diese Hypothese wird auch durch einen Kontrollversuch (3.3.3) erhärtet. Bei diesem Versuch wurde ein Pferd zuerst während 90 Min. im Schritt geführt. Anschließend wurde ein Versuch im Stehen gemacht und die Eliminationskonstante k mit den Versuchsreihen im Schritt und im Stehen verglichen. Die Eliminationsrate dieses Versuchs entspricht den Eliminationsraten der Versuchsserie in Ruhe. Jedenfalls zeigen die Versuche, dass zumindest für Equines Serum Albumin die Eliminationskonstante k aus dem Gelenk in Ruhe nicht gleich gross ist wie in Bewegung der Pferde (vgl. Annahme von Persson (1971)).

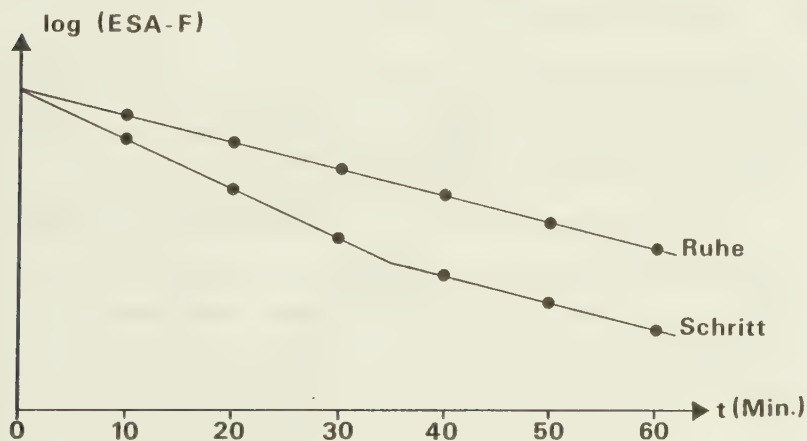


Abb. 15

Hypothetischer Kurvenverlauf (Konzentration von ESA-F gegen die Zeit t) bei einer Volumenänderung innerhalb der ersten fünfunddreissig Minuten

4.2 Viskositätsmessungen

Eine Volumenzunahme der Gelenksinhalte durch Vermischung der Synovia mit eindringendem Serum (Eisenmenger (1968)) hätte eine Erniedrigung der Viskosität der Versuche im Schritt gegenüber den Ruheversuchen zur Folge. Bei beiden Versuchsreihen ergab sich durchschnittlich eine Abnahme der Viskosität der Gelenksflüssigkeit. Diese Abnahme ist etwa gleich gross wie die Abnahme, welche zurückzuführen ist auf das chirurgische Einsetzen der Braunüle ins Gelenk (vgl. Kap. 3.2 und Abb. 7). Die Versuche im Schritt ergaben keine stärkere, sondern eher eine schwächere Abnahme der Viskosität gegenüber den Ruheversuchen (relative Viskosität nach 60 Min. im Schritt: $89.1 \% \pm 10.5 \%$ und in Ruhe: $74.4 \% \pm 13.8 \%$). Die Hypothese der Volumenzunahme im Gelenk durch eindringendes Blutserum muss aufgrund dieser Ergebnisse eher verworfen werden.

4.3 Brechungsindex

Eine Volumenzunahme der Gelenksinhalte durch Vermischung der Synovia mit eindringendem Serum (Eisenmenger (1968)) hätte eine Erhöhung des Brechungsindex der Versuche im Schritt gegenüber den Ruheversuchen zur Folge. Diese Erhöhung war nicht nachzuweisen: bei beiden Versuchsreihen änderte sich der Brechungsindex während der ganzen Messdauer nicht. Die Volumenzunahme im Gelenk durch eindringendes Blutserum muss aufgrund dieser Ergebnisse eher verworfen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An neun Pferden wurden die vorderen Fesselgelenke mittels Braunülen für eine möglichst schonende Entnahme von Synovialproben zugänglich gemacht. Es wurden im Stehen und im Schritt über eine Zeitdauer von 70 bis 120 Minuten Proben entnommen. Mittels der Verdünnung von fluoreszenzmarkiertem Pferdealbumin wurde das Anfangsvolumen des Gelenks gemessen. Ausserdem wurde der Verlauf der Konzentration des Albumins im Gelenk sowie die Viskosität und der Brechungsindex der Synovialproben bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Albuminkonzentration sollte Aufschluss geben über ein eventuelles Vorhandensein und über die mögliche Art einer Volumenveränderung der Gelenksinhalte im Stehen bzw. im Schritt der Pferde. Der zeitliche Verlauf der Viskosität und des Brechungsindex sollte Aufschluss geben über ein eventuelles Einströmen von Serum ins Gelenk. Aus dem zeitlichen Verlauf dieser Grössen konnte geschlossen werden, dass das Synovialvolumen unabhängig von der Bewegung der Pferde zu sein scheint. Jedenfalls kann eine Volumenerhöhung durch ins Gelenk diffundierendes Blutserum ausgeschlossen werden.

6. BIBLIOGRAPHIE

de Bernardo, S. et al. (1974):

On the Reaction of Fluorescamine with Primary Amines.
Archives of Biochemistry and Biophysics 163, 390 - 399

Eisenmenger, E. (1968):

Zbl. Vet. Med. A, 15, 255 - 321

Ekman, L., Nilsson, G. und Persson, L. (1974):

Volume of the Synovia in Certain Joint Cavities in the Horse.
Dept. of Clinical Biochemistry and Surgery, Royal Veterinary College
S - 104 05 Stockholm, Sweden (Persönliche Mitteilung)

Jebens, E.H. (1959):

On the Viscosity and pH of Synovial Fluid and the pH of Blood.
J. Bone Jt. Surgery 41 B, 388 - 400

van Pelt, R.W. (1962):

J. Am. Vet. Med. Ass. 141, 1051

Persson, L. (1971):

On the Synovia in Horses
Acta Vet. Scand. Suppl. 35

Poncet, P.A. (1976):

Contribution à l'étude des valeurs normales cellulaires,
protéiniques et enzymatiques du liquide synovial du cheval.
Dissertation der vet. med. Klinik der Universität Bern.

Siegenthaler, W. (1976):

Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag Stuttgart, 1976

Smith, J.M., Ratzlaff, M.H., Grant, B.D. und Frank, F.L. (1979):
The Synovial Fluid Volume of the Radiocarpal, Intercarpal and
Tibiotarsal Joints of the Horse.
Intern. Orthopaedics 3, 479 - 483

Travis, J. und Pannel, R. (1973):
Selective Removal of Albumin from Plasma by Affinity
Chromatography.
Clin. Chim. Acta 49, 49 - 52

Travis, J., Bowen, J., Tewksbur, D., Johnson, D. und Pannel, R. (1976):
Isolation of Albumin From Whole Human Plasma and Fractionation of
Albumin in Depleted Plasma.
Biochem. J. 157, 301 - 306

von Wechmar, M.B. und van Regenmortel, M.H.V. (1970):
A Simple Procedure for Purifying Tobacco Mosaic Virus Strains.
South African Medical J. 44, 151

Wille, L.E. (1976):
Simple and Rapid Method for Isolation of Serum-Lipoproteins from
other Serum Constituents.
Clin. Chim. Acta 71, 355

Danken möchte ich

- Herrn Prof. Dr. A. Müller für die Anregung zu dieser Arbeit
- Herrn Prof. Dr. C.C. Kuenzle für das Korreferat
- Meinem Vater und seinem Team am Institut für Molekularbiologie für die Hilfsbereitschaft und die grosszügige Unterstützung des chemischen und physikalischen Teils der Arbeit
- Herrn Dr. Ch. Fricker für die Leitung des chirurgischen Teils der Arbeit
- Herrn PD Dr. von R. Fellenberg für die lebenswürdige Ueberlassung des gereinigten Pferdealbumins
- Herrn F. Ackermann für die zeichnerischen und grafischen Arbeiten

Mein Dank gilt auch den anderen ungenannten Helfern, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

CURRICULUM VITAE:

Name: SCHWYZER

Vorname: Arnold Robert

Bürgerort: Zürich

Geburtsdatum: 20. Oktober 1950

Schulen:

1956 - 1960	Primarschule Riehen, BS
1960 - 1963	Humanistisches Gymnasium Basel
1964	Eckstein Jr. High School, Seattle, Wash., USA
1965 - 1969	Literargymnasium Zürich
1969	Matura, Typ B
1969 - 1973	Chemiestudium an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) in Lausanne und Zürich
1973	Chemiediplom der ETH-Z Diplomarbeit: Untersuchungen an synthetischen Phospholipiden mit der IR-ATR-Technik (Laboratorium für physikalische Chemie der ETH Prof. Hs.H. Günthard)
1974 - 1979	Veterinärstudium an der Universität Zürich
1979	Staatsexamen
1980	Assistent an der Veterinär-Chirurgischen Klinik der Universität Zürich
seit 1981	Assistent bei prakt. Tierarzt

